

br03/00192

PCT/BR03/192



REC'D 12 JAN 2004

WIPO PCT

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes


CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0205449-3 de 09/12/2002.

Rio de Janeiro, 12 de Dezembro de 2003.


GLÓRIA REGINA COSTA
Chefe do NUCAD
Mat. 00449119



DEINPI/SP

9 DEZ 1991 005863

DEPÓSITO DE PATENTE

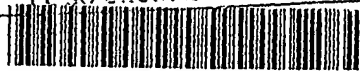
Protocolo

Número (21)

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição



depósito

PI0205449-3

Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1. Nome: 1) BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA

1.2. Qualificação.: Sociedade Brasileira

1.3. CGC/CPF: 49475833000360

1.4. Endereço completo: Av. dos Bandeirantes, 5386 - Planalto Paulista - São Paulo - SP

1.5. Telefone: (011) 3663-2211

Fax: (011) 3663-0469

(X) continua em folha anexa

2. Natureza

☒ 2.1. Invenção

☐ 2.1.1. Certificado de Adição

☐ 2.2. Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada:

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

“PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU PRODUTOS ASSOCIADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES DOS EVASINS E SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS E/OU CONFORMACIONAIS EM DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS”

() continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº _____, de ____/____/____

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:-

Nº do depósito

Data de Depósito (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

7. Inventor (72):

() Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º LPI e item 1.1. do Ato Normativo nº 127/97)

7.1. Nome: 1) Antonio Carlos Martins de Camargo
2) Robson Augusto Souza dos Santos
3) Rubén Dario Sinisterra Millán

7.2. Qualificação: 1) médico; 2) médico; e 3) químico

7.3. Endereço: 1) Rua Mirajuba, 125 – Alto de Pinheiros – São Paulo – SP
2) Rua Deputado Wilson Tanure, 48 – Sta. Amélia – Belo Horizonte – MG
3) Rua João Antonio Cardoso, 64, apto. 301 – Belo Horizonte – MG

7.4. CEP.: 1) 05467-010; 2) 31560-240; e 3) 31310-390 **7.5. Telefone:** (011) 3663-2211

8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

() em anexo

9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97)

() em anexo

10. Procurador (74):

10.1. Nome.: CRUZEIRO/NEWMARC PATENTES E MARCAS LTDA

CGC nº: 46.160.644/0001-48

10.2. Endereço: Rua Itajobi, 79 - Pacaembu - São Paulo - SP

10.3. CEP.: 01246-010

10.4. Telefone: (011) 3663-2211

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

X	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	X	11.5 Relatório descritivo	29 fls.
X	11.2 Procuração	01 fls.	X	11.6 Reivindicações	05 fls.
	11.3 Documentos de prioridade	fls.		11.7 Desenhos	fls.
	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	x	11.8 Resumo	01 fls.
	11.9 Outros (especificar): Declaração				01 fls.
X	11.10 Total de folhas anexadas:				38 fls

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

09 DEZ 2002

São Paulo _____
Local e Data

CRUZEIRO/NEWMARC PATENTES E MARCAS LTDA.

Assinatura e Carimbo

Nº API: 00502

FOLHA ANEXA

Depositantes

1. Depositante (71):

1.1. Nome: 2) Antonio Carlos Martins de Camargo;

1.2. Qualificação.: médico

1.3. CGC/CPF: 262.880.878-15

1.4. Endereço completo: Rua Murajuba, 125 – Alto de Pinheiros – São Paulo - SP

1.5. Telefone: (011) 3663-2211

Fax: (011) 3663-0469

1. Depositante (71):

1.1. Nome: 3) Robson Augusto Souza dos Santos

1.2. Qualificação.: médico

1.3. CGC/CPF: 223.158.536-72

1.4. Endereço completo: Rua Deputado Wilson Tanure, 48 – Sta. Amélia – Belo Horizonte - MG

1.5. Telefone: (011) 3663-2211

Fax: (011) 3663-0469

1. Depositante (71):

1.1. Nome: Rubén Dario Sinisterra Milán

1.2. Qualificação.: químico

1.3. CGC/CPF: 143.004.298-20

1.4. Endereço completo: Rua João Antônio Cardoso, 64 – Apto. 301, Belo Horizonte - MG

1.5. Telefone: (011) 3663-2211

Fax: (011) 3663-0469

“PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU PRODUTOS ASSOCIADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES DOS EVASINS E SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS E/OU CONFORMACIONAIS EM DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS”.

5 A presente invenção caracteriza-se pelo processo de preparação de formulações farmacêuticas para o desenvolvimento de aplicações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais em doenças crônico-degenerativas. Caracteriza-se ainda pelo processo de preparação das formulações farmacêuticas e/ou produtos associados dos peptídeos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais usando as ciclodextrinas, seus
10 derivados, lipossomas e os polímeros biodegradáveis e/ou misturas desses sistemas. A presente invenção compreende a identificação de outros mecanismos bioquímicos e fisiofarmacológicos de ação dos Evasins, com aplicação no estudo e tratamento de doenças crônico-degenerativas.

Na maioria dos países do mundo, de 15% a 25% da população adulta apresenta
15 pressão arterial elevada (MacMahon, S. et. Al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease, Lancet 335:765-774, 1990). O risco cardiovascular aumenta com o nível de pressão arterial. Quanto mais alta a pressão arterial, maior o risco de acidente vascular cerebral e eventos coronarianos. Considerada a principal responsável por doenças coronarianas, cerebrais e vasculares renais, a hipertensão é a principal causa de morte e incapacidade entre
20 adultos.

A insuficiência cardíaca é em nível mundial a principal causa de hospitalização na faixa etária de 60 a 80 anos. Só o envelhecimento da população já é fator de aumento de sua incidência, enquanto 1% dos indivíduos apresentam insuficiência cardíaca na faixa de 25 a 54 anos, entre os mais idosos a incidência é muito maior, atingindo cerca de 10% naqueles
25 com mais de 75 anos (Kannel, W. B. et. al. Changing epidemiological features of cardiac failure, Br. Hear J 1994; 72 (suppl): S3-S9).

A insuficiência cardíaca pela sua característica clínica é doença limitante, que com o seu agravamento reduz a qualidade de vida dos pacientes e, nas formas avançadas, tem características de doença maligna com mortalidade superior a 60% no primeiro ano, mesmo
30 nos dias de hoje (Oliveira, M.T. Características clínicas e prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva avançada, Faculdade de Medicina, USP 1999). Calcula-se que atualmente são afetados mais de 15 milhões de indivíduos só no mundo industrializado

e que só nos EUA, por exemplo, o número de casos tenha aumentado 450% entre 1973-1990 (Kannel, W.B. et. El. Changing epidemiological features of cardiac failure, Br. Hear J 1994; 72 (suppl 3): S3-S9).

A hipertensão é complexa, multifatorial, de alta prevalência, responsável por inúmeros efeitos deletérios e alta morbimortalidade (Kaplan, N. M. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. JAMA. 275:1571-1576, 1996). Inúmeros estudos para avaliação da eficácia de seu controle na população em geral e em grupos especiais têm sido desenvolvidos, objetivando o seu melhor entendimento. O controle pressórico sem ampla intervenção não medicamentosa e/ou farmacêutica nos fatores de riscos associados (diabete, obesidade, tabagismo) pode reduzir ou mesmo desprover os benefícios do tratamento a longo prazo de hipertensão arterial na redução da mortalidade, em geral, por doença coronariana (Wilson, P. W. et. al. Hypertension, the risk factors and the risk of cardiovascular disease. Raven Press. 94-114).

A hipertensão é a patologia que mais contribui para a arterosclerose cardiovascular (The fifth Report of the Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of High Blood Pressure. National Institute of Health (VJNC). Arch. Intern. Med. 153:154-181, 1994). Segundo estatísticas, de cada quatro americanos, um é ou será hipertenso, sendo que são estimadas 4,78 milhões de pessoas com insuficiência cardíaca. A cada ano 400 mil novos casos são diagnosticados, provocando 800 mil hospitalizações, com um gasto de US\$ 17,8 bilhões de dólares no tratamento.

No Brasil dados do SUS mostraram que, em 1997, a insuficiência cardíaca foi a principal causa de hospitalizações entre as doenças cardíacas, tendo o governo gasto R\$ 150 milhões no tratamento, equivalente a 4,6% das despesas com a saúde (Filho, Albanesi F. Insuficiência cardíaca no Brasil. Arq. Bras. Cardiol, 71:561-562, 1998).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é responsável pela regulação da pressão arterial, da homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Krieger, E. M.; Santos, R. A. S. Angiotensinas – aspectos fisiológicos. Hipertensão, 1:7-10, 1998). A angiotensina II (Ang II) é o principal peptídeo efetor do SRA, possuindo ações vassopressora, estimuladora da síntese de esteróides adrenais, proliferativa (fibroblastos, músculo liso vascular) e hipertróficas (miócitos cardíacos). Sua via de formação envolve a produção de angiotensinogênio pelo fígado e a produção de renina no aparelho justa glomerular. Essas substâncias são liberadas na corrente

sangüínea onde o angiotensinogênio é hidrolisado pela renina, formando a Ang I, que, no pulmão sofrerá ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) e originará a Ang II. Essa por sua vez, exercerá suas ações em órgãos-alvo distantes do local de sua produção (Krieger, E. M.; Santos, R. A. S. Angiotensinas – aspectos fisiológicos. Hipertensão, 1: 7-10, 1998).

5 Recentemente descobriu-se que além do sistema que gera Ang II circulante, diferentes tecidos contém SRA independentes que geram a Ang II, aparentemente para ação local. Os componentes do SRA tecidual, são encontrados nas paredes dos vasos sangüíneos, no útero, na porção exócrina do pâncreas, olhos, coração, córtex adrenal, testículo, ovários, lobos anterior e intermediário da hipófise, pineal e cérebro. As funções desses SRAs
10 teciduais não estão muito bem esclarecidas. (Ardaillou, R.; Michel, J. B. The relative roles of circulating and tissue renin-angiotensin systems. Nephrol. Dial. Transplant., 14:283-286,1999). As ações locais do SRA podem ocorrer em nível da célula que produz os peptídeos (funções intrácina e autócrina), sobre células adjacentes (função parácrina) ou em locais distantes da região de produção (função endócrina).

15 Observações recentes indicam que importantes ações periféricas e centrais do SRA podem ser mediadas por sequências menores de peptídeos angiotensinérgicos, incluindo Ang III [Ang-(2-8)], Ang IV [Ang-(3-8)] e Ang-(1-7). Podemos considerar que tanto a Ang I [Ang-(1-10)], como a Ang II [Ang-(1-8)] podem sofrer um processo de biotransformação, gerando uma “família” de peptídeos de angiotensina biologicamente ativos. (Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Andrade, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. Regulatory Peptides , 91:45-62, 2000).
20

A angiotensina-(1-7) é um dos peptídeos da “família” das angiotensinas biologicamente ativos, sendo formada por uma via independente da ECA. O processamento da Ang I pela NEP ou Prolil-endopeptidase ou da Ang II por prolil-endopeptidase, prolil-carboxipeptidases ou ECA-II geram o heptapeptídeo Ang-(1-7). Depois de formada, a Ang-
25 (1-7) pode ser hidrolisada por amino-peptidases gerando Ang-(2-7) e Ang-(3-7). A hidrólise da Ang-(1-7) pela ECA origina Ang-(1-5). (Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Andrade, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. Regulatory Peptides , 91:45-62, 2000).

A Ang-(1-7) juntamente com a Ang II, são os principais efetores do SRA. Duas
30 características importantes separam a Ang-(1-7) da Ang II: a primeira possui ações biológicas altamente específicas e sua via de formação é independente da ECA (Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Andrade, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. Regulatory

Peptides , 91:45-62, 2000). Os Evasins favoreceriam a formação de Ang-(1-7), por aumentar a concentração de Ang I e reduziria seu metabolismo, via inibição da ECA.

O objetivo primário do tratamento da hipertensão não só visa a queda dos gastos, como também a prevenção das lesões em órgãos-alvo, através das modificações da qualidade de vida e do uso de medicamentos, quando necessário. (The Fifth Report of The Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of High Blood Pressure. National Institute of Health (VJNC). Arch. Intern. Med. 153:154-181, 1994).

O tratamento medicamentoso tem indicação frente à não resposta às mudanças de estilo de vida após um período de três a seis meses, e na vigência de lesões em órgãos-alvo (hipertrofia ventricular esquerda, isquemia do miocárdio, acidente vascular encefálico ou retinopatia hipertensiva). Todos os pacientes com pressão arterial sistólica superior a 180 mmHg ou pressão arterial diastólica maior que 110 mmHg devem ser submetidos a tratamento farmacológico, independente de outros fatores presentes ou não (Report the Canadian Hypertension Society. Consensus Conference. 3. Pharmacological treatment of essential hypertension. Can. Med. Assoc. J. 149 (3): 575-584, 1993).

Durante os anos 70 e 80, entretanto, os anti-hipertensivos tornaram-se uma ferramenta importante no tratamento da pressão arterial elevada (Ménard, J. Anthology of renin-angiotensin system: A one hundred reference approach to angiotensin II antagonista. J. Hypertension 11 (suppl 3): S3-S11, 1993). Durante as últimas quatro décadas, a pesquisa farmacológica produziu novas classes de drogas para tratar a hipertensão: os diuréticos nos anos 60, os beta-bloqueadores nos anos 70, os bloqueadores do canal de cálcio, os antagonistas dos receptores da angiotensina II e os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA).

Os diuréticos podem ser divididos em três categorias: tiazídicos de alça e os poupadores de potássio. Os tiazídicos e similares incluem Clorotiazida e Hidroclotiazida, os quais apresentam nos primeiros dias de tratamento diminuição da pressão arterial em torno de 10 a 15 %, estando relacionada esta queda com a diminuição do volume extracelular secundário e aumento da diurese e natriurese. Então, após seis meses, o volume plasmático e o débito cardíaco retornam a valores normais e a diminuição da pressão arterial é relacionada com a diminuição da resistência vascular periférica (Frolich, E. Current Approaches in the treatment of Hypertension, 405-469). São habitualmente utilizados em monoterapia, apresentando melhores respostas em pacientes de raça negra e, em baixas

doses, nos idosos. Têm como efeitos colaterais: aumento da resistência periférica a insulina, aumento dos triglicerídios, aumento do LDL, hipocalcemia, hiperurcemia. Entre os diuréticos de alça temos Furosemida, Bumetamida e Triantereno, sendo diuréticos muito mais potentes que os tiazídicos. Atuam predominantemente nas porções medulares e corticais da alça de henle. Apresentam os mesmos efeitos colaterais que os tiazídicos. Já os poupadores de potássio são drogas de ação diurética fraca, sendo raramente utilizados isoladamente. Dentre eles temos Amilorida, Triatereno e Espironolactona.

Os beta-bloqueadores, entre eles o Atenolol e Naolol, são classificados em beta-1 e beta-2. O mecanismo de ação anti-hipertensiva não está totalmente estabelecido, porém podem decorrer basicamente do fato de que os beta-bloqueadores inibem os receptores beta pré-sinápticos impedindo a liberação de noradrenalina. Têm como efeitos colaterais: alteração da resposta à insulina, prolongam o coma hipoglicêmico, aumentam os triglicerídios e aumentam a creatinina por diminuição do fluxo renal.

Os bloqueadores dos canais de cálcio são utilizados há pelo menos 25 anos (Frolich, E. D. Current Approaches in the Treatment of Hypertension, 405-469, 1994). Podem ser reunidos em dois grandes grupos, de acordo com suas ações farmacológicas: os que exercem maior ação na condução do estímulo, como Verapamil e o Diltiazem e aqueles que apresentam ação predominante vasodilatadora, como os derivados diidropirínicos (Nifedipina e outros) (Frolich, E. D., Hypertension. Adult Clinical Cardiology Self Assessment Program (ACCSAP), 6: 3-19, 1995). Têm como efeitos colaterais edema de membros inferiores e taquicardia.

Os inibidores da enzima conversora têm como ação principal inibir a conversão da angiotensina II. Dessa forma, ações essencialmente vasoconstritora da angiotensina II são minimizadas. Estudos preliminares mostraram que o teprotide (Evasin-9a), o primeiro inibidor usado clinicamente, exerce atividade anti-hipertensiva quando ministrado via intravenosa, porém é inativo por via oral, o que limitou seu emprego. Sabe-se atualmente que a ECA é uma enzima com ações múltiplas, isto é, que atua em diversos substratos. Além de agir como uma dipeptidase na angiotensina I e na bradicinina, é capaz também de clivar as cadeias peptídicas do peptídeo natriurético, indicando que a enzima pode atuar em diversos tecidos. A ECA tem papel importante na inativação da Ang-(1-7) circulante e tecidual. A concentração desse peptídeo circulante é semelhante a concentração da Ang II e mostra-se aumentada após inibição da ECA. Esse aumento pode ser devido ao aumento do

Foram encontradas no estado da técnica as seguintes patentes que relatam a atividade do omapatrilat: US2002013307-A1, Kothari and Desai; US2002004500-A1 (WO200174348-A2, AU200187289-A), Bristo-Myers Squibb Co (BRIM) and Reeves et al.; US6166227-A (WO200003981-A2, AU9948528-A), Bristol-Myers Squibb Co (BRIM) and Godfrey et al. No entanto esse composto e seus análogos apresentaram efeitos colaterais importantes (angioedema e tosse) devido a sua alta atividade inibitória sobre a endopeptidase neutra (NEP).

Esses medicamentos são excelentes quando ministrados em monoterapia, uma vez que os inibidores da ECA provocam queda relativamente rápida da pressão arterial em 60 a 70% dos pacientes com hipertensão arterial (Ganong, W. Neuropeptides in cardiovascular control. J. Hypertens 2 (suppl 3): 15-22, 1984). São em geral bem tolerados, mas seu uso pode acarretar efeitos colaterais e reações adversas, algumas das quais relativamente graves, entre elas, edema angioneurótico, erupções cutâneas e tosse seca (8 a 10%), discrasias sangüíneas e impotência sexual.

As primeiras tentativas de desenvolver antagonistas da Ang II datam do início da década de 70 e concentraram-se no desenvolvimento de peptídeos análogos à Ang II. Os primeiros, saralasina, 1-sarcosina, 8-isoleucina angiotensina II, e posteriormente outros. No entanto, não tiveram aceitação clínica, pois apresentavam atividade agonista parcial. Em 1982, foram desenvolvidos dois primeiros antagonistas dos receptores AT₁ e não peptídicos (S-8307 e S-8308) que, embora fossem altamente específicos e sem atividade agonista, apresentavam fraca ligação aos receptores da Ang II. Com uma série de modificações na estrutura molecular desses dois precursores, para melhorar a potência, reter a seletividade e atingir as propriedades farmacocinéticas, um novo produto de uso oral, potente e de alta especificidade, foi desenvolvido o Losartan: A partir de então, muitos outros antagonistas não-peptídicos foram desenvolvidos, tais como Candesartan, Irbesartan, Valsartan, Telmisartan, Eprosartan, Tasosartan e Zolasartan.

A angiotensina-(1-7), (Asp-Ang-Val-Tir-Ile-His-Pro) e seu derivativo Sar¹-Ang-(1-7) também antagonizam os efeitos pressores da Ang II no homem (Ueda S, Masumori-Maemoto S, Ashino K, Nagahara T, Gotoh E, Umemura S, Ishii M. Angiotensin-(1-7)

attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. Hypertension 2000; 35:998-1001) e ratos (Bovy PR, Trapani AJ, McMahon EG, Palomo M. A carboxy-terminus truncated analogue of angiotensin II [Sar¹] angiotensin II-(1-7)-amide, provides an entry to a new class of angiotensin II antagonists. J Med Chem. 1989; 32:520-522). A contração produzida pela Ang II em artérias isoladas de coelhos e humanos também é reduzida pela angiotensina-(1-7) (Bovy PR, Trapani AJ, McMahon EG, Palomo M. A carboxy-terminus truncated analogue of angiotensin II [Sar¹] angiotensin II-(1-7)-amide, provides an entry to a new class of angiotensin II antagonists. J Med Chem. 1989; 32:520-522. Roks AJ, Van-Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, de Zeeuw D, van-Gilst WH. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. Hypertension 1999; 34(2):296-301).

A formulação da presente invenção caracteriza-se pelo uso da mistura de excipientes aceitáveis farmacologicamente combinados Evasins e análogos. Podem ser preparadas formulações com um excipiente ou misturas desses. Exemplos de excipientes incluem água, solução salina, soluções tamponadas com fosfato, a solução de Ringer, solução de dextrose, a solução de Hank, soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietileno glicol. Outras formulações úteis incluem agentes capazes de aumentar a viscosidade, como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, ou dextran. Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos, como substâncias que aumentam isotonicidade e estabilidade química de substância ou tampões. Exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de preservativos incluem timerosal, meta- ou orto-cresol, formalin e benzil-álcool. As formulações padrões podem ser líquidas ou sólidas. Desta forma, uma formulação não-líquida, o excipiente pode incluir dextrose, albumina de soro humano, preservativos, etc, para qual água ou solução salina estéril pode ser acrescentada antes da administração.

A presente invenção caracteriza-se ainda pela preparação de sistemas de liberação controlada contendo Evasins e análogos. Os sistemas de liberação controlada satisfatórios incluem, mas não são limitados as ciclodextrinas, polímeros biocompatíveis, polímeros biodegradáveis, outras matrizes poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparações de *bolus*, bombas osmóticas, dispositivos de difusão, lipossomas, lipoesferas, e sistemas de administração transdérmicos. Outras composições de liberação controlada da

(13)

US4598070 (CA1215359, DK356684, EP135044, ES8506757, GR82322, JP60025967), Mashiro, Kawahara et. al. (1986), desenvolveram uma invenção a qual relata a obtenção de compostos de inclusão entre Tripudine (anti-hipertensivo) e ciclodextrinas (α -ciclodextrina e β -ciclodextrina). O Tripamide é pouco solúvel em água, portanto a utilização de ciclodextrinas fez com que fossem obtidos compostos mais solúveis. Esta invenção utilizou também algumas técnicas de caracterização como: calorimetria diferencial exploratória (DSC) e difração de raios-X.

14

US5519012, Fercej-Temeljoov, Darja et. al. (1996), desenvolveram uma invenção baseada na obtenção de um novo composto de inclusão de um anti-hipertensivo, o 1,4-diidropiridina, com metil-(β -ciclodextrina e outros derivados como (β -ciclodextrina hidroxilada.

US5728402, Chen, Chih-Ming et. al. (1998), publicaram uma invenção baseada na liberação controlada de fármacos, através de uma composição farmacêutica contendo uma fase interna composta por captopril e hidrogel, e uma outra fase externa insolúvel no estômago. Esse invento teve como objetivo aumentar o tempo de absorção do fármaco que quando aplicado isoladamente é de 1 hora.

US5834432, (AU5990796, CA2221730, EP0828505, WO09639164, JP115073625),
Rodgers, Katlen Elizabeth et. al. (1998), utilizaram agonistas dos receptores AT2 para
acelerar a cicatrização de ferimentos.

US6087386 (WO9749392A1) Chen, Tzyy-Show H. et. al. (2000) publicaram uma invenção que apresenta uma composição farmacêutica composta por Enalapril (inibidor da ECA) e Losartan (antagonista da AII), sendo uma camada de Losartan Potássico e outra camada de

Maleato de Enalapril. Essa invenção objetivou-se no melhoramento da ação farmacológica, diminuindo os efeitos colaterais e aumentando o tempo de absorção.

US6178349, Kieval, Roberts S. et. al. (2001) desenvolveram um aparelho baseado na liberação de fármacos via estimulação neural para o tratamento de doenças cardiovasculares.

5 Esse aparelho constitui-se de eletrodo conectado ao nervo, um gerador de pulso implantável e um reservatório que contém o fármaco a ser aplicado. Durante o uso o eletrodo e a liberação do fármaco estimula o nervo, o qual afeta o controle sobre o sistema cardiovascular.

Vinte e um peptídeos potenciadores da bradicinina encontrados no veneno e nos
10 tecidos da Bothrops jararaca (genericamente denominados de BPPs ou bradykinin potentiating peptides), tiveram suas seqüências de aminoácidos determinadas por espectrometria de massa ou deduzidas do cDNA dos precursores dessas moléculas expressos em tecidos não de glândula de veneno dessa serpente (denominados **Evasins** ou **Endogenous Vasopectidase Inhibitors**).

15	<u>Nomenclatura</u>	<u>Seqüência</u>
	EVASIN-5a	<EKWAP
	EVASIN-5b	<EWPRP
	EVASIN-5c	<EKFAP
	EVASIN-6a	<ESWPGP
20	EVASIN-7a	<EDGPIPP
	EVASIN-9a	<EWPRPQIPP
	EVASIN-9b	<ESWPGNIPP
	EVASIN-10a	<ESWPGPNIPP
	EVASIN-10b	<ENWPRPQIPP
25	EVASIN-10c	<ENWPHPQIPP
	EVASIN-10d	<ESWPEPNIPP
	EVASIN-11a	<EGRAPGPPIPP
	EVASIN-11b	<EGRAPHPPIPP
	EVASIN-11c	<EGRPPGPPIPP
30	EVASIN-11d	<EARPPHPPIPP
	EVASIN-12a	<EGWAWPRPQIPP
	EVASIN-12b	<EWGRPPGPPIPP

(15)
/

EVASIN-13a	<EGGWPRPGPEIPP
EVASIN-13b	<EGGLPRPGPEIPP
EVASIN-13c	<EGGWPRPGPQIPP

A maioria desses peptídeos apresenta o motivo estrutural C-terminal PX^1X^2PP , onde onde X^1 pode ser qualquer aminoácido e X^2 geralmente é um resíduo de isoleucina (I), e o aminoácido N-terminal é bloqueado, freqüentemente pela presença de um resíduo de ácido piroglutâmico (<E). Os peptídeos sintéticos correspondentes foram testados como inibidores do sítio C e N da ECA recombinante, e como potenciadores, tanto da atividade contrátil da bradicinina em íleo isolado de cobaia, como da atividade hipotensora da bradicinina em ratos. Os mais seletivos e eficazes como potenciadores da ação contrátil da bradicinina em íleo isolado de cobaia e ação da hipotensora na pressão arterial de ratos foram aqueles compreendidos entre as massas de 500 a 1700 Daltons, contendo de 5 a 13 resíduos de aminoácidos. As moléculas ativas foram modificadas quimicamente dando origem a outros peptídeos com características qualitativamente semelhantes.

Os Evasins, oligopeptídeos de 5 a 13 aminoácidos, formulados na presente invenção estão descritos a seguir:

<u>Fórmulas</u>	<u>Seqüências</u>	<u>Nomenclatura</u>
I	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ P ⁵	Evasin-5a, b, ..., n
II	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ P ⁶	Evasin-6a, b, ..., n
III	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ P ⁶ P ⁷	Evasin-7a, b, ..., n
IV	<E ¹ aa ² aa ³ P ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ P ⁸	Evasin-8a, b, ..., n
V	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ P ⁹	Evasin-9a, b, ..., n
VI	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ P ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ P ¹⁰	Evasin-10a, b, ..., n
VII	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ aa ⁸ aa ⁹ P ¹⁰ P ¹¹	Evasin-11a, b, ..., n
VIII	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ aa ⁹ aa ¹⁰ P ¹¹ P ¹²	Evasin-12a, b, ..., n
IX	<E ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ aa ¹⁰ aa ¹¹ P ¹² P ¹³	Evasin-13a, b, ..., n

onde:

P é sempre prolina. Os demais poderão ser L- ou D-aminoácidos e derivados que estão apresentados com o código de três e de uma letra

ácido aspártico (Asp, D)	ácido glutâmico (Glu, E)
alanina (Ala, A)	arginina (Arg, R)
asparagina (Asp, D)	fenilalanina (Phe, F)

glicina (Gly, G)

histidina (His, H)

leucina (Leu, L)

prolina (Pro, P)

5 tirosina (Tyr, Y)

triptofano (Trp, W)

ácido aminobutírico (Abu)

ácido diaminobutanóico (Dab)

ácido hexanóico (ϵ -Ahx)

10 ácido piroglutamico (Pyr, <E)

ácido tetrahydroisoquinolina-3-carboxílico (Tic)

butil-glicinaciclohexilalanina (Cha)

citrulina (Cit)

fenilglicina (Phg)

15 homoserina (Hse)

norvalina (Nva)

penicilalanina (Pen)

ietilalanina (Thi)

<E¹ ácido piroglutâmico é o aminoácido N-terminal;

20 aa² é um aminoácido geralmente W, S, ou K para as fórmulas I e II, geralmente D para fórmula III e geralmente W, S, G ou N para as fórmulas IV a IX;

aa³ é geralmente W, P, F ou G para as fórmulas I a III e geralmente P, G, W ou R para as fórmulas IV a IX;

25 aa⁴ é um aminoácido geralmente P, A ou R para as fórmulas I a III e geralmente P, A, R ou W para as fórmulas IV a IX;

aa⁵ é um aminoácido geralmente R ou I para as fórmulas II e III e geralmente T, P, G, H, R, W ou E para as fórmulas IV a IX;

aa⁶ é um aminoácido geralmente Q, N, P, T, H, R ou G para as fórmulas V, VII, VIII e IX; é freqüentemente I, A, T ou Y para a fórmula IV

30 aa⁷ é um aminoácido geralmente N, Q, G ou R para as fórmulas VI, VIII e IX e é freqüentemente I, A, T ou Y para a fórmula V;

glutamina (Gln, Q)

isoleucina (Ile, I)

lisina (Lys, K)

serina (Ser, S)

treonina (Thr, T)

valina (Val, V)

ácido aminoisobutírico (Aib)

ácido diaminopropiônico (Dpr)

ácido isonipecótico (Isn)

estatina e derivados (Sta)

hidroxiprolina (Hyp)

norleucina (Nle)

ornitina (Orn)

sarcosina (Sar)

17

aa⁸ é um aminoácido geralmente Q, P ou G para as fórmulas VII e IX é freqüentemente I, A, T ou Y para a fórmula VI;

aa⁹ é um aminoácido geralmente Q, N ou G para a fórmula VIII é freqüentemente I, A, T ou Y para a fórmula VII;

5 aa¹⁰ é um aminoácido geralmente Q e E para a fórmula IX e é freqüentemente I, A, T ou Y para a fórmula VIII;

aa¹¹ para a fórmula IX é freqüentemente I, A, T ou Y;

10 Uma outra característica da presente invenção é a possibilidade de modificação de todas as moléculas dos EVASINs com o intuito de melhorar suas propriedades farmacocinéticas e de especificidade de ação sobre diferentes moléculas-alvo envolvidas em patologias cardiovasculares, quer como inibidores de vasopectidases como de ação sobre células endoteliais e músculo liso de vasos através de modificações químicas que consistem:

1) **modificações conformacionais localizadas** por substituição de L-aminoácidos por D-aminoácidos levando a introdução de uma estrutura β -“turn” reversa (“hairpin”) ou por introdução de amino ácidos α -substituídos tornando o eixo da cadeia polipeptídica numa estrutura de α -hélice ou na conformação estendida ou em β -“turn” como por exemplo a introdução do α -aminoisobutírico. Também é prevista uma substituição N-metil de um α -aminoácido restringindo a ação da ligação amida, eliminando a formação de ponte de hidrogênio, afetando o ângulo de torção da cadeia polipeptídica principal e permitindo a formação ligação peptídica cis. Uma outra modificação é a substituição da ligação amida do peptídeo por uma ligação covalente não amidica de forma a proteger essa ligação contra a ação de proteases.

20 2) **Modificações conformacionais globais** por ciclização estabilizando estruturas secundárias: Os dois amino ácidos de escolha para serem substituídos por cisteína ou por outros compostos orgânicos contendo, por exemplo, um grupo tiol cada como um análogo do β,β -dimetilpenicilamina, pode ser qualquer um dos resíduos de amino ácidos das seqüências dos EVASINs ou de seus análogos, estando separados um do outro de pelo menos dois resíduos de amino ácidos da cadeia polipeptídica. Favorece-se então a formação de uma ponte S-S entre os dois resíduos tiólicos, por exemplo, e forma-se assim um peptídeo cíclico. A ciclização pode também ser obtida
30 pela formação de uma ligação lactâmica, ou de ligação peptídica entre o grupo

carboxílico e amino livres do polipeptídeo ou qualquer outro procedimento químico que favoreça a ciclização do peptídeo.

- 3) **Modificações das cadeias laterais dos amino ácidos (χ -“constraints”)** a determinação dos ângulos de torção das cadeias laterais de α -amino ácidos pode permitir modificações topológicas que melhor ajuste o polipeptídeo ao seu sítio de ligação como por exemplo a substituição da tirosina por β -metil-2',6'-dimetiltirosina (TMT) podendo definir uma conformação preferencial ao sítio de interação. As alterações propostas foram referidas e exemplificadas na revisão de Victor J. Hruby publicada na revista Nature, 1, 847-858, 2002.

A presente invenção caracteriza-se pela obtenção de sistemas de liberação dos oligopeptídeos, EVASINs, usando as ciclodextrinas e seus derivados que diminuem a degradação pelo trato gastrointestinal (TGI), significando maior biodisponibilidade do peptídeo no sistema biológico.

Um fármaco pode ser quimicamente modificado para alterar suas propriedades como biodistribuição, farmacocinética e solubilidade. Vários métodos têm sido usados para aumentar a solubilidade e estabilidade das drogas, entre eles o uso de solventes orgânicos, emulsões, lipossomas, ajuste de pH, modificações químicas e complexação dos fármacos com um agente encapsulante apropriado como as ciclodextrinas, lipossomas e o microencapsulamento em polímeros biodegradáveis.

As ciclodextrinas foram isoladas pela primeira vez em 1891 por Vilers, como produtos de degradação do amido pela ação da amilase do *Bacillus macerans*. Em 1904, Schardinger as caracterizou como oligossacarídeos cíclicos. Em 1938 Frudenberg e colaboradores relataram que as ciclodextrinas são constituídas de unidades de glicose unidas pela ligação (α 1 \rightarrow 4). Em 1948 Freudenberg e colegas verificaram que as ciclodextrinas apresentam a capacidade de formar compostos ou complexos de inclusão e, mais tarde, assim como French e colaboradores, elaboraram processos de sínteses de ciclodextrinas puras. Cramer e colaboradores, a partir de 1954, realizaram estudo sistemático da formação de complexos de ciclodextrinas com outros compostos. Entre 1955 e 1960 realizaram-se os primeiros estudos sobre a formação de complexos de inclusão de ciclodextrinas com fármacos. Esses estudos prosseguem intensamente no Japão, Hungria, França, Itália e outros países.

As ciclodextrinas são obtidas por degradação enzimática do amido. Os métodos constam das seguintes fases: produção e purificação da enzima, transformação enzimática do amido e recuperação e separação das ciclodextrinas. A enzima envolvida é uma ciclodextrina-glicosiltransferase (CGT). Sendo ela obtida de diversos microrganismos, mas principalmente *Bacillus macerans*, *B. megatherium*, *B. stereothermophilus* e *Klebsiella pneumoniae*. (Korolkovas, A. Inclusão molecular e ciclodextrinas: propriedades e aplicações terapêuticas. ENLACE Farmalab, 2/91, Ano 5, Vol. II, p.6-15).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que incluem seis, sete ou oito unidades de glucopiranosose. Devido a interações estéricas, as ciclodextrinas, CDs, formam uma estruturas cíclica na forma de cone truncado com uma cavidade interna apolar. Trata-se de compostos quimicamente estáveis que podem ser modificados de maneira regio-seletiva. As ciclodextrinas (hospedeiros) formam complexos com várias moléculas, hidrófobas (convidados) incluindo as mesmas de forma completa ou em parte na cavidade. As CDs têm sido usadas para a solubilização e encapsulação de drogas, perfumes e aromatizantes como descrito por Szejtli, J., Chemical Reviews, (1998), 98, 1743-1753. Szejtli, J., J. Mater. Chem., (1997), 7, 575-587. Conforme estudos detalhados de toxicidade, mutagenecidade, teratogenicidade e carcinogenicidade sobre as ciclodextrinas, descritos em [Rajewski, R.A., Stella, V., J. Pharmaceutical Sciences, (1996), 85, 1142-1169], essas se apresentam com baixa toxicidade, em especial da hidroxipropil-(α -ciclodextrinas, como relatado em Szejtli, J. Ciclodextrins: Properties and applications. Drug Investig., 2(supl. 4): 11-21, 1990. Exceto para altas concentrações de alguns derivados, que provocam danos aos eritrócitos, esses produtos em geral não acarretam riscos à saúde. A utilização das ciclodextrinas como aditivos em alimentos já foi autorizada em países como Japão e a Hungria e para aplicações mais específicas, na França e na Dinamarca. Todas essas características são uma motivação crescente para a descoberta de novas aplicações.

Além das ciclodextrinas, também são utilizados polímeros biodegradáveis, os quais diminuem a velocidade de absorção dos fármacos no organismo, através dos dispositivos de liberação controlada. Nestes sistemas as drogas são incorporadas em uma matriz polimérica baseando-se no encapsulamento das drogas em microesferas, ou nanoesferas as quais liberam a droga no interior do organismo, em pequenas e controláveis doses diárias, durante dias, meses ou até anos.

Vários polímeros já foram testados em sistemas de liberação controlada. Muitos em função de suas propriedades físicas, tais como: poli(uretanos) por sua elasticidade, poli(siloxanos) ou silicone por ser um bom isolante, poli(metil-metacrilato) por sua força física, poli(vinil álcool) por sua hidrofobicidade e resistência, poli(etileno) por sua dureza e impermeabilidade (Gilding, D. K. Biodegradable polymers. Biocompat. Clin. Implat. Mater. 2: 209-232, 1981).

Entretanto, para uso em humanos, o material deve ser quimicamente inerte e livre de impurezas. Alguns dos materiais utilizados em sistemas de liberação são: poli(2-hidroxietilmetacrilato), poliacrilamida, polímeros na base de ácido láctico (PLA), na base de ácido glicólico (PGA), e os respectivos co-polímeros, (PLGA) e os poli (anidridos) tais como os polímeros na base de ácido sebásico PSA e os co-polímeros com polímeros hidrofóbicos.

A presente invenção caracteriza-se ainda pela obtenção de sistemas de liberação controlada dos oligopeptídeos, Evasins usando os lipossomas que aumentam a biodisponibilidade do peptídeo. Lipossomas são vesículas lipídicas que incluem compartimentos internos aquosos em quais moléculas, por exemplo, drogas, podem ser encapsuladas com objetivo de alcançar uma liberação lenta da droga depois de administração do lipossoma em um indivíduo.

São relatados no estado da técnica muitas patentes para a preparação de lipossomas [Pat US 4,552,803, Lenk; Pat US 4,310,506, Baldeschwieler; Pat US 4,235,871, Papahadjopoulos; Pat US 4,224,179, Schneider; Pat US 4,078,052, Papahadjopoulos; Pat US 4,394,372, Alfaiate; Pat US 4,308,166, Marchetti; Pat US 4,485,054, Mezei; e Pat US 4,508,703, Redziniak; Woodle e Papahadjopoulos, Methods Enzymol. 171:193-215 (1989)].

Lipossomas unilamelares têm uma única membrana que inclui um volume aquoso [Huang, Biochemistry 8:334-352 (1969)] enquanto lipossomas multilamelares têm numerosas membranas concêntricas [Bangham et Col., J. Mol. Biol. 13:238-252 (1965)]. Veículos a base de lipossomas foram propostos para uma variedade de substâncias farmacologicamente ativas, inclusive antibióticos, hormônios e agentes anti-tumorais [Medical applications of liposomes (D.D. Lasic, D. Papahadjopoulos Ed.), Elsevier Science B.V., Holanda, 1998].

Outros processos de preparação de lipossomas tem sido encontrados no estado da técnica, [para uma revisão, veja, por exemplo, Cullis et al., in: Liposomes, From Biophysics to Therapeutics (M. Ostro, ed.), Marcel Dekker (New York), 1987, pp. 39-72; Woodle and

91

Papahadjopoulos, *Methods Enzymol.* 171:193-215 (1989); *Liposome technology* (G. Gregoriadis ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1993].

O procedimento de Bangham [J. Mol. Biol. 13:238-252 (1965)] produz "lipossomas multilamelares ordinários" (MLVs). MLVs "ordinários" podem ter distribuição de soluto desigual entre os compartimentos aquosos e, assim, apresentar diferença de pressão osmótica entre compartimentos. Lenk et Col. (Pat US4,522,803; US 5,030,453 e US 5,169,637), Fountain et al. (Pat US 4,588,578), Cullis et al. (Pat US4,975,282) e Gregoriadis et al. (Pat. WO99/65465) descobriram métodos para preparação de lipossomas multilamelares que têm distribuição de soluto substancialmente igual entre os compartimentos. Uma distribuição igual de soluto entre os diferentes compartimentos significa uma maior eficiência de encapsulação do medicamento assim como uma diferença de pressão osmótica menor o que torna esses MLVs mais estáveis que os MLVs ordinário.

Podem ser produzidos lipossomas unilamelares por sonication dos MLVs [veja Papahadjopoulos et al. (1968)] ou por extrusão através de membranas de polycarbonato [Cullis et Col. (Pat US 5,008,050) e Loughrey et Col. (Pat US 5,059,421)]. Lipídeos satisfatórios incluem, por exemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, cardiolipin, colesterol, ácido fosfatídico, esfingolipídeos, glicolipídeos, ácidos graxos, esteróis, fosfatidiletanolamina, fosfolipídeos polimerizáveis na sua forma polimerizada ou não-polimerizada declara, e misturas desses lipídeos.

As composições dos lipossomas da presente invenção caracterizam-se pela modificação das vesículas fornecendo-lhes uma especificidade para órgãos ou para células. O direcionamento dos lipossomas foi classificado, baseando-se em fatores anatômicos e nos mecanismos envolvidos. A classificação anatômica está baseado no nível de seletividade, por exemplo, órgão-específico, célula-específico ou organela-específico. Do ponto de vista dos mecanismos, o direcionamento pode ser considerado como passivo ou ativo.

O direcionamento passivo utiliza a tendência natural dos lipossomas convencionais serem capturados pelas células do sistema de reticulo-endothelial em órgãos que contém capilares sinusoidais. Os lipossomas da presente invenção são estabilizados estéricamente através do método (LEE) (também conhecido como "PEG-lipossomas") como veículo de medicamento melhorado, devido a sua velocidade de eliminação reduzida da circulação sangüínea [Lasic e Martin, *Stealth Liposomes*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995)]. LEE são lipossomas, cuja superfície é recoberta por um polímero, em que o polímero,

preferentemente polietileno glicol (PEG), é conjugado covalentemente a um dos fosfolípidos e cria uma nuvem hidrófila fora da bicamada da vesícula. Essa barreira estérica atrasa o reconhecimento dos lipossomas pelas opsoninas e permite que os LEE permaneçam mais tempo na circulação que os lipossomas convencionais [Lasic e Martin, *Stealth Liposomes*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995); Woodle et Col., *Biochim. Biophys. Acta* 1105:193-200 (1992); Litzinger et Col., *Biochim. Biophys. Acta* 1190:99-107 (1994); Bedu Addo, et Col., *Pharm. Res.* 13:718-724 (1996)] e aumentam a eficácia farmacológica dos agentes encapsulados, como foi demonstrado para alguns quimioterapêuticos [Lasic e Martin, *Cautela Lipossomas*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995)] e peptídeos bioativos [Allen T.M. In: *Liposomes, New Systems, New Trends in their Applications* (F. Puisieux, P. Couvreur, J. Delattre, J.-P. Devissaguet Ed.), Editions de la Santé, França, 1995, pp. 125].

Estudos nesta área demonstraram que diferentes fatores afetam a meia-vida de circulação dos LEE, e idealmente, o diâmetro das vesículas deveria ser abaixo de 200 nm, com PEG de peso molecular de aproximadamente 2.000 Da, em uma proporção de 5% [Lasic e Martin, *Cautela Lipossomas*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995); Woodle et Col., *Biochim. Biophys. Acta* 1105:193-200 (1992); Litzinger et Col., *Biochim. Biophys. Acta* 1190:99-107 (1994); Bedu Addo et Col., *Pharm. Res.* 13:718-724 (1996)].

O direcionamento ativo envolve alteração dos lipossomas através da sua associação com um ligante como um anticorpo monoclonal, açúcar, glicolípido, proteína, polímero ou mudando a composição ou o tamanho dos lipossomas para direcioná-los para órgãos e células diferentes dos locais onde se acumulam os lipossomas convencionais. Veja, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Gannaro, A. R., ed., Mack Publishing, 18th edition, pp. 1691-1693.

Lipossomas contendo Ang-(1-7) foram micro-injetados unilateralmente (35 ng de Ang-(1-7) em 200 nL) no bulbo rostro ventrolateral (BRVL) com uma agulha (30 G) que foi inserida lentamente no tecido cerebral pela superfície dorsal, usando as coordenadas estereotaxis: 1.8 mm anterior, 1.8 lateral ao obex, e só sobre o pia-mater. Lipossomas vazios (Lvaz) foram micro-injetados semelhantemente na mesma dose de lipídeo. A pressão arterial foi registrada por telemetria durante 10 segundos, a cada 10 minutos, começando 4 dias antes e terminando 12 dias depois, em ratos não perturbados com liberdade de movimento. A micro-injeção de LAng produziu um efeito pressor significativo durante o período diurno

24

15

20

25

30

falha renal ou nefropatia diabética, hipertrofia ventricular esquerda, afinamento vascular, re-
estenoses-pós angioplastia, angiopatia diabética, esquemia periférica, angina e progressão de
insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio e aterosclerose.

A presente invenção pode ser melhor entendida através dos seguintes exemplos não
5 limitantes.

Exemplo 1: SÍNTESE DOS EVASINS PELO MÉTODO DE SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA

Os oligopeptídeos foram sintetizados de acordo com a metodologia encontrada
no estado da técnica. A estratégia Boc baseia-se nos ensinamentos contidos em Barany, G.
10 & Merrifield, R.B. (Gross, E. & Meinhofer, J., Eds.) (1980), The Peptides: Analysis,
Synthesis and Biology, vol. II, 1, Academic Press, New York. 2-Stewart, J.M. & Young,
J.D. (1984), Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford.

Os Evasins sintéticos foram purificados em sistema de HPLC e o material eluído
foi analisado por espectrometria de massa.

Exemplo 2: MODIFICAÇÕES CONFORMACIONAIS LOCALIZADAS, CONFORMACIONAIS GLOBAIS E DAS CADEIAS LATERAIS DOS AMINOÁCIDOS DAS MOLÉCULAS DOS EVASINS

Os oligopeptídeos foram modificados de acordo com a metodologia encontrada no
estado da técnica. As alterações propostas foram referidas e exemplificadas na revisão de
20 Victor J. Hruby publicada na revista Nature, 1, 847-858, 2002.

Exemplo 3: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EVASINS SINTÉTICOS

Para purificação dos Evasins sintéticos utiliza-se o sistema de HPLC. Os solventes
utilizados foram todos de grau HPLC e a água utilizada foi obtida por destilação e filtração
25 em sistema de Milli-Q, da Millipore, equipado com cartuchos para a retenção de sais e de
compostos orgânicos.

As frações provenientes da purificação foram submetidas à análise por
espectrometria de massa para confirmação da massa molar dos Evasins após purificação.

Exemplo 4: ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA 30 INIBIÇÃO DA ECA PELOS EVASINS

Os ensaios enzimáticos para inibição da ECA recombinante foram realizados
utilizando o substrato Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-DpaOH, a 25° C, em tampão 50 mM Hepes

(25)
4

(pH 6,8), 200 mM NaCl e 10 μ M ZnCl₂. A monitoração contínua das reações foi realizada através determinação do aumento da fluorescência a $\lambda_{em} = 390$ nm ($\lambda_{ex} = 340$ nm), proporcionados pela clivagem do substrato ($S = K_m$, 40 μ M) pela ECA, em fluorímetro. Os Evasins foram pré-incubados com a enzima antes da adição do substrato. Os ensaios enzimáticos com a ECA somática para determinação das constantes de inibição dos Evasins sobre os dois sítios catalíticos N- e C-terminais foram realizados conforme Cotton e cols, 2002.

Os resultados dos valores de K_i para a inibição da ECA pelos Evasins foram na ordem de nM. A maioria dos Evasins foi inibidores seletivos para o sítio C-terminal, o Evasin-10c, por exemplo, apresentou um valor de $K_i = 0,5$ nM sendo 400 vezes mais seletivo para este domínio. Enquanto outros Evasins apresentaram inibição seletiva para o sítio N-terminal, por exemplo, os valores de K_i s obtidos com o Evasin-12b foram de 5 nM e 150 nM para os sítios N e C-terminais, respectivamente.

Exemplo 5: ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA NEP PELOS EVASINS

Os ensaios fluorimétricos para a inibição da NEP recombinante foram realizados utilizando o substrato Abz-RL-EDDnp em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, a 37° C. A monitoração contínua das reações foi realizada através determinação do aumento da fluorescência a $\lambda_{em} = 418$ nm ($\lambda_{ex} = 318$ nm), proporcionados pela clivagem do substrato ($K_m = 8,4$ μ M) pela NEP, em fluorímetro. Os Evasins foram pré-incubados com a enzima antes da adição do substrato. Os ensaios enzimáticos com a NEP para determinação das constantes de inibição dos Evasins foram realizados conforme Ianzer, D.A., 2001.

Os valores das constantes de inibição (K_i) foram determinados através da relação da constante de inibição aparente ($K_{i(app)}$) e o K_m do substrato (Salvesen e Nagase, 1990).

Os Evasins são inibidores não muito potentes da NEP, os resultados dos valores de K_i para a inibição da NEP pelos Evasins foram na ordem de μ M. Um dos melhores inibidores foi o Evasin-9a que apresentou um valor de $K_i = 86$ μ M.

Exemplo 6: TESTE DA ATIVIDADE POTENCIADORA DA BRADICININA DOS EVASINS ENSAIO BIOLÓGICO EM ÍLEO ISOLADO DE COBALA

A atividade potenciadora dos peptídeos sintéticos foi testada sobre a atividade contrátil de musculatura lisa provocada pela bradicinina e foram determinados os valores de

UP utilizando a preparação de íleo isolado de cobaia. UP corresponde a concentração do Evasin (nmol/mL de preparação) capaz de transformar o efeito da resposta de uma dose simples de bradicinina a equivalente ao dobro.

Foram utilizadas cobaias fêmeas. Antes de iniciar os ensaios, o íleo foi mantido em solução Tyrode. Em seguida, uma das extremidades do segmento do íleo de 1,5 a 2,0 cm foi amarrada a um semi-anel presente no fundo de uma cuba de vidro, contendo solução fisiológica de Tyrode a 37° C com borbulhamento constante de oxigênio através de um capilar, sendo que a outra extremidade foi amarrada a uma alavanca inscritora previamente calibrada. A tensão mantida foi de 1 g e as contrações do íleo isolado de cobaia foram registradas. Para determinar o efeito potenciador das amostras sobre a bradicinina, uma curva log-dose resposta do efeito da bradicinina sobre o íleo isolado de cobaia foi traçada. A atividade de bradicinina é determinada pela medição das contrações do íleo isolado de cobaia e a atividade potenciadora é expressa em termos de aumento da resposta tecidual a uma dose padrão de bradicinina conforme Shimuta e cols., 1981.

Os Evasins foram testados individualmente e foram adicionados antes da adição de uma dose simples de bradicinina. As diluições das amostras foram preparadas com água deionizada no momento do emprego. A resposta medida foi interpolada na parte linear da curva log dose-efeito, obtendo-se a atividade potenciadora em termos do aumento da resposta da preparação para uma dose padrão de bradicinina. Solução TYRODE: 20 mL de solução estoque I, 40 mL da solução estoque II, 1 mL de solução de difenidramina (1 mg/mL), 1 mL de solução atropina (1 mg/mL), 5,60 mM D-glicose e H₂O q.s.p. 1 L. Todos os reagentes utilizados neste experimento foram de grau analítico.

Todos os Evasins potenciam a ação contrátil da bradicinina em íleo isolado de cobaia dobrando o efeito contrátil da bradicinina em concentrações que variaram de 0,22 a 30 nmoles.

Exemplo 7: AÇÃO DOS EVASINS SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATO ANESTESIADO

A atividade potenciadora do efeito hipotensivo da bradicinina foi testada em ratos anestesiados. Ratos machos normotensos (WKY) foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (Hypnol[®] Cristália, 50 mg/kg, via intraperitoneal) e colocados sobre uma placa com temperatura controlada para a manutenção da temperatura corporal entre 36,5 °C e 37 °C. Utilizou-se um polígrafo acoplado a um transdutor fisiológico. Os valores da variação da

pressão arterial foram obtidos integrando-se as áreas delimitadas pela linha de base pressórica e comparando-as com os valores obtidos com experimentos controles. Nos ensaios in vivo foi verificada a atividade de potenciação dos Evasins sobre o efeito hipotensor da bradicinina na pressão arterial de rato anestesiado. Os ensaios foram realizados conforme Hayashi e cols., 2002.

Foram determinados dois parâmetros para comparação dos efeitos de potenciação da bradicinina na PA de rato anestesiado:

1) Intensidade do efeito potenciador da atividade hipotensora da bradicinina na pressão arterial de ratos anestesiados: Esse valor foi definido como a porcentagem (%) de aumento da hipotensão provocada por uma dose simples de bradicinina obtida após infusão de 200 nmol de potenciador. 2) Duração do efeito potenciador: Tempo necessário para reduzir em 50 % o efeito do potenciador sobre uma dose simples de bradicinina.

O efeito hipotensor da bradicinina foi potenciado pelos Evasins na faixa entre 40 – 340 % em ratos anestesiados, por injeção endovenosa, em concentração fixa de 200 nmoles de Evasin/rato. Foi verificada duração mínima de 10 minutos chegando a ultrapassar 120 minutos, para a redução em 50% do efeito potenciador inicial.

Exemplo 8: PREPARAÇÃO DOS EVASINS E SEUS ANÁLOGOS EM MICROSFERAS DE PLGA E A LIBERAÇÃO PROLONGADA DOS EVASINS DA FORMULAÇÃO RESULTANTE.

Partículas poliméricas foram preparadas, a partir de co-polímeros do ácido lático e glicólico (PLGA 50:50), pelo método da emulsão múltipla A/O/A com posterior evaporação do solvente [Jeffery et al. Int. J. Pharm. 77:169-175 (1991)]. Tal método foi empregado para o encapsulamento dos EVASINS com as seguintes etapas. 100 mg de polímero PLGA (50:50 p/p) foi dissolvido em 1 mL de diclorometano. Em seguida, foi adicionado 1,8 mg de EVASINS, previamente dissolvido em 200 µL de água deionizada, e a mistura foi submetida à sonicação para obtenção de uma emulsão água/óleo (A/O). A emulsão A/O resultante foi adicionada à 50 mL de uma solução de PVA 1 % (p/v) em água desionizada. A mistura foi submetida à sonicação (5000 rotações/minuto) por aproximadamente 1 minuto. Deste modo é formada a segunda emulsão água/óleo/água (A/O/A). A emulsão foi mantida em agitação constante por 2 horas em temperatura ambiente para evaporar o diclorometano. Em seguida, as microesferas formadas foram submetidas à 3 ciclos de centrifugação/lavagem com água desionizada. As microesferas foram então liofilizadas e armazenadas em 20°C.

Para se determinar a quantidade de peptídeo incorporada, o peptídeo foi extraído das partículas poliméricas depois da dissolução do polímero em diclorometano. A dosagem do peptídeo foi realizada por radioimunoensaio [Neves et al., Biochem. Pharmacol. 50:1451-1459 (1995)]. A quantidade incorporada foi de 1,9 mg peptídeo por g de microesferas o que representa um percentual de incorporação de 15 %.

A cinética de liberação do peptídeo foi avaliada após resuspensão das microesferas em solução salina tamponada (pH 7,2) e incubação em 37°C. Essas condições experimentais representam condições fisiológicas modelo. O peptídeo liberado foi dosado por radioimunoensaio nos intervalos de 8 h, 24 h e 48 h. A percentagem de peptídeo liberado das microesferas em condições fisiológicas modelo foi aproximadamente 60% em 8 h e cerca de 90% em 48 h. Portanto, esse exemplo ilustra a capacidade de as microesferas poliméricas promover uma liberação prolongada do peptídeo.

Exemplo 9: PREPARAÇÃO DO COMPOSTO DE INCLUSÃO ENTRE A β -CICLODEXTRINA E SEUS DERIVADOS E OS EVASINS E SEUS ANÁLOGOS.

A preparação é feita em proporções equimolares de β -ciclodextrina e seus derivados e os Evasins e seus análogos em soluções aquosas. A mistura de soluções é submetida à agitação constante até a completa dissolução da β -ciclodextrina. Posteriormente a mistura é congelada a temperatura de nitrogênio líquido e submetida ao processo de liofilização por 24 horas. O sólido assim obtido foi caracterizado através de técnicas físico-química de análises. A técnica que forneceu características importantes da interação hospedeiro:convidado foi a fluorescência.

A preparação foi realizada em proporções equimolares de ciclodextrina e peptídeos. Na tabela abaixo estão descritos os compostos de inclusão preparados. Estes sistemas foram submetidos aos testes biológicos.

Tabela: Compostos de inclusão entre ciclodextrinas e peptídeos que foram submetidos aos testes biológicos

Peptídeo	Ciclodextrina
EVASIN-5a	β -Ciclodextrina
EVASIN-7a	β -Ciclodextrina
EVASIN-9a	β -Ciclodextrina
EVASIN-10c	β -Ciclodextrina

EVASIN-5a	HP- β -CD
EVASIN-7a	HP- β -CD
EVASIN-9a	HP- β -CD
EVASIN-10c	HP- β -CD
EVASIN-12b	HP- β -CD

Após o preparo das soluções e da simulação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da HB- β -CD e dos peptídeos, foi dado início à etapa de caracterização por RMN do composto de inclusão HB- β -CD/BPP-5a, bem como do BPP-5a e HB- β -CD livres, estando os espectros de Ressonância, apresentados nas figuras 14 – 20.

5 Baseando-se nas respectivas simulações para o BPP-5a, analisou-se o espectro real do composto puro, fazendo as atribuições:

- 1) O espectro de RMN ^1H , bem como o COSY, apresentam um intenso sinal a 4.8 ppm, devido à presença da impureza " H_2O " no solvente deuterado.
- 2) Próximo ao sinal da água, estão presentes os hidrogênios dos grupos " CH " que servem de ponte de ligação entre as ligações peptídicas e grupos funcionais dos aminoácidos.
- 10 3) Na região compreendida entre os valores de deslocamento químico 2.8 – 3.7 ppm, estão presentes os grupamentos " CH_2 " ligados aos grupos " CH " vizinhos às ligações peptídicas.
- 4) Entre 1.3 – 2.5 ppm aproximadamente, estão presentes multipletos referentes aos " CH_2 " presentes em grupos funcionais diversos.
- 15 5) Em 1.2 ppm, observa-se um duplete referente ao grupo CH_3 do segmento do aminoácido Alalina. Através do COSY, pode-se observar o acoplamento escalar deste grupo com um " CH " a 4,6 ppm (quarteto).
- 20 6) A região compreendida entre a faixa de deslocamento químico de 7.7 – 7.1 ppm, foi atribuída ao sistema de spins do grupo aromático (correspondente ao segmento do aminoácido Triptofano).

Quanto ao espectro da HP- β -CD, este demonstrou ser muito complexo, de difícil atribuição, mesmo tomando como base, o espectro simulado. Contudo, é possível atribuir alguns sinais listados a seguir:

25 Entre deslocamentos químicos 3.3 a 4.3 ppm, verifica-se um complexo multipletos devido aos grupos " CH " dos carbonos ligados às hidroxilas. No intervalo de deslocamento químico entre 1.1 a 1.8 ppm, encontram-se os sinais devido aos grupos hidroxipropil.

Com relação ao experimento de RMN do composto de inclusão, fazendo-se uma comparação com o espectro do BPP-5a puro, observa-se uma clara separação das linhas espectrais com uma conseqüente variação de deslocamento químico na região dos grupos aromáticos ($\delta \approx 7.7 - 7.1$). Este resultado sugere o possível encapsulamento do grupo aromático na cavidade da HP- β -CD.

Exemplo 10: EFEITO DOS EVASINs E DOS EVASINs NA FORMA ENCAPSULADA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATO TRANSGÊNICO TGR (mREN2)L27 ACORDADO

Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a cirurgia para canulação da artéria e veia femural. Os ratos transgênicos foram anestesiados com éter e colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Foi realizada uma pequena incisão na pele, separando a musculatura para localização do feixe vâsculo-nervoso femural. As cânulas foram introduzidas na veia cava inferior através da veia femural, para administração da droga e aorta abdominal através da artéria femural, para registro dos parâmetros cardiovasculares. Após a introdução das cânulas, estas foram amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico. A seguir, as mesmas foram dirigidas subcutaneamente com auxílio de um trocater para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro dos parâmetros cardiovasculares e a cânula venosa para administração de drogas.

O registro da pressão arterial e frequência cardíaca foi feito um dia após a canulação da artéria e veia femural, e o experimento realizado com os animais não-anestesiados e com livre movimentação. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão conectado ao transdutor.

Antes da administração da droga foi monitorada a PAP, a PAM e a FC dos ratos. Após a injeção *in bolus* do Evasin num volume total de 0,2 mL (solução de NaCl a 0,9%) foi monitorado o efeito hipotensor causado e a tempo de duração desse efeito. Neste ensaio foram testadas doses padrão de cada peptídeo (70 nmol /100 g de peso corporal). Com $n = 4$.

O Evasin-9a foi o peptídeo mais potente com o melhor efeito hipotensor, apresentado uma queda de $-30,5 \pm 2,42$ mmHg na pressão arterial média, seguido do Evasin-10c com queda de média da PAM de $-26,3 \pm 2,87$ mmHg. O Evasin-5a apresentou queda máxima da PAM de $-22,2 \pm 4,26$ mmHg, muito parecido com o efeito máximo do Evasin-7a de $-20,5 \pm 1,84$ mmHg.

(31)
✱

5 já não foi mais notado o efeito hipotensor na PAM dos ratos transgênicos.

Exemplo 11: EFEITO DOS EVASINs NA FORMA ENCAPSULADA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATO TRANSGÊNICO TGR (mREN2)L27 ACORDADO

Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a cirurgia para canulação da artéria e veia femural. Os ratos transgênicos foram anestesiados com éter e colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Foi realizada uma pequena incisão na pele, separando a musculatura para localização do feixe vaso-nervoso femural. As cânulas foram introduzidas na veia cava inferior através da veia femural, para administração da droga e na aorta abdominal através da artéria femural, para registro dos parâmetros cardiovasculares. Após a introdução das cânulas, estas foram amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico. A seguir, as mesmas foram dirigidas subcutaneamente com auxílio de um trocater para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro dos parâmetros cardiovasculares e a cânula venosa para administração de drogas.

O registro da pressão arterial e frequência cardíaca foi feito um dia após a canulação da artéria e veia femural, e o experimento realizado com os animais não-anestesiados e com livre movimentação. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão conectado ao eletrofisiógrafo.

Antes da administração da droga foi monitorada a PAP, a PAM e a FC dos ratos. Após a injeção *in bolus* do Evasin num volume total de 0,2 mL (solução de NaCl a 0,9 %) foi monitorado o efeito hipotensor causado e a tempo de duração desse efeito. Neste ensaio foram testadas doses padrão de cada peptídeo (70 nmol /100 g de peso corporal). Com n = 4.

Comparando os resultados obtidos com a administração do Evasin-5a na forma livre e com a utilização do Evasin-5a incorporado ao composto de inclusão não foi verificada nenhuma diferença no efeito hipotensor na administração do pentapeptídeo livre ou na forma encapsulada. Verificamos a diferença no tempo de duração do efeito, onde o Evasin-5a encapsulado foi capaz de aumentar mais de 4 vezes o tempo de duração do efeito do peptídeo livre.

Exemplo 12: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DOS EVASINs SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS SHR MONITORADOS PELO SISTEMA DE TELEMETRIA

Um sistema de telemetria foi utilizado para medir a pressão sistólica, diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca. Esse sistema de monitoramento consiste de um dispositivo implantável de rádio frequência, uma placa receptora, uma matriz, e um computador acompanhado de um software para aquisição e análise dos dados (Braga, et al., 2002).

Foram utilizados ratos SHR machos. Os animais foram deixados em jejum 24 horas antes da cirurgia. Sob anestesia por 2,2,2-tribromoetanol 2,5 % (1mL/100 g de peso corporal) o rato foi colocado em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica, a região abdominal ventral foi depilada e submetida à assepsia com álcool iodado. Uma incisão de aproximadamente 2 cm na linha mediana abdominal foi feita para obter uma boa visualização da área da bifurcação ilíaca. Os intestinos foram retraídos para permitir um completo acesso aos vasos sanguíneos abdominais. Os tecidos adiposos e conectivos, ao longo do leito vascular, foram delicadamente removidos com auxílio de cotonetes e gazes até a identificação da aorta abdominal e seu isolamento da veia cava. Um cordonet umedecido em salina envolvia a aorta para impedir o fluxo sanguíneo e um pequeno corte foi feito usando uma agulha (25 x 8) dobrada em um ângulo de 90°. Em seguida, usando uma pinça guia, o cateter de polietileno do dispositivo recebeu o gel biocompatível e foi inserido na artéria. A área da entrada do cateter foi limpa e seca e uma quantidade mínima de cola de tecido foi aplicada. Sobre a cola foi colocado um pequeno pedaço de papel de celulose para fixar o cateter na aorta. A bateria do dispositivo foi ativada com o imã e usando um rádio AM não sintonizado foi feito o registro do som característico da posição do cateter na aorta. A musculatura abdominal foi suturada prendendo o dispositivo pela sua alça de silicone. Em seguida, a pele foi suturada. A assepsia foi feita com álcool iodado e a seguir 0,1 mL de pentabiótico foi administrado por via intramuscular. Os animais foram colocados em gaiolas individuais e permaneceram em ambiente aquecido até a recuperação total da anestesia. Após a recuperação, os animais foram levados a sala de telemetria climatizada a 25° C com ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00 às 18:00hs dia e 18:00 às 6:00 hs noite). A água e ração foram fornecidas à vontade.

33
d

Antes do início do experimento, os animais foram alojados em gaiolas individuais (15 cm x 12 cm x 6 cm) e mantidos por 8 dias até os traçados telemétricos indicarem o restabelecimento da pressão sanguínea e frequência cardíaca. Os dados foram amostrados a cada 10 minutos por 10 segundos/24 horas.

Os resultados obtidos com os Evasin-7a e Evasin-10c encapsulados ao composto de inclusão β -ciclodextrina mostrou que esses dois peptídeos apresentam atividade hipotensora em ratos espontaneamente hipertensos.

O Evasin-7a apresentou duração de 9 horas com queda máxima de PAM de 20 mmHg após 5 horas e em 8 horas após a administração do peptídeo e 5 horas, respectivamente. O Evasin-10c teve duração máxima de efeito hipotensor de 5 horas, com queda máxima de 13 mmHg.

Exemplo 13: BIODISTRIBUIÇÃO DOS EVASINS

A introdução endovenosa de Evasins marcados com I_{125} , através do método da cloramina T, em camundongos mostrou que esses peptídeos se concentram marcadamente nos rins. Por exemplo, a injeção endovenosa do Evasin10c- I_{125} revelou após 15 minutos que esse peptídeo apresentava uma concentração de cerca de 2 vezes maior por grama de tecido, nos rins que nos pulmões e fígado. Nos demais tecidos e no sangue a concentração do peptídeo radioativo foi significativamente menor. Essa diferença aumenta nos rins em relação aos demais tecidos, atinge o máximo após 30 minutos caindo rapidamente nos tecidos e muito mais lentamente nos rins onde permanece na concentração de cerca de 50% da concentração máxima após 3 horas de sua administração. Esse mesmo perfil de distribuição foi observado quando o peptídeo radioativo foi introduzido juntamente com o captopril numa concentração molar 10 vezes maior superior a do peptídeo, apenas reduzindo em cerca de 30% a concentração máxima atingida pelo peptídeo radioativo comparado àquela obtida na ausência de captopril.

Tanto a biodistribuição dos Evasins como seu tempo de permanência nos rins mostrou que os Evasins tem maior seletividade pelos rins permanece por um tempo mais prolongado ligado àquele tecido que o captopril.

Este exemplo descreve a melhoria da biodisponibilidade dos Evasins seguindo sua administração na forma encapsulada em lipossomas estabilizados estericamente.

A preparação dos Evasins na forma encapsulada em lipossomas foi realizada de acordo com o método de Kirby e Gregoriadis [Biotecnologia 2:979-984, 1984] e seguida por extrusão da

(34)

suspensão de DRV através de membranas de policarbonato de poro de diâmetro de 200 nm [Nayar et al. Biochim. Biophys. Acta. 986:200-206 (1989)]. Os lipossomas contendo o peptídeo encapsulado foram separados de peptídeo não encapsulado através de diálise e foram esterilizados através de filtração em membranas estéreis de 0,22 micrometros. Uma
5 composição lípídica de diestearoil-fosfatidilcolina, colesterol e diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (P.M. 2.000) e uma relação molar de 5:4:0,3 foram escolhidos. A quantidade de peptídeo encapsulado foi determinada usando a fluorescência intrínseca dos Evasins. A eficiência de encapsulação alcançada foi de 12% e uma relação
10 peptídeo/lípídeo de 0,03 (p/p). O tamanho do lipossomas foi determinado através da técnica por difusão quasi-elástica da luz. O diâmetro médio das vesículas foi de 0,19 micrometro.

(35)
d

REIVINDICAÇÕES:

1. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais caracterizado pela preparação de compostos de inclusão e/ou associação entre os Evasins e seus análogos estruturais globais e/ou conformacionais cíclicos conformacionais localizados ("hairpin") e com cadeias laterais com modificações topológicas com as ciclodextrinas, seus derivados, lipossomas e os polímeros biodegradáveis e/ou misturas.
2. Processo de preparação de formulações caracterizado pelo uso dos Evasins:

Oligopeptídeos de 5-13 aminoácidos**Fórmulas Seqüências****Nomenclatura**

I	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 P^5$	Evasin-5a, b,... n
II	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 aa^5 P^6$	Evasin-6a, b,... n
III	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 aa^5 P^6 P^7$	Evasin-7a, b,... n
IV	$\langle E^1 aa^2 aa^3 P^4 aa^5 aa^6 P^7 P^8$	Evasin-8a, b,... n
V	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 aa^5 aa^6 aa^7 P^8 P^9$	Evasin-9a, b,... n
VI	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 aa^5 P^6 aa^7 aa^8 P^9 P^{10}$	Evasin-10a, b,... n
VII	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 aa^5 aa^6 P^7 aa^8 aa^9 P^{10} P^{11}$	Evasin-11a, b,... n
VIII	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 aa^5 aa^6 aa^7 P^8 aa^9 aa^{10} P^{11} P^{12}$	Evasin-12a, b,... n
IX	$\langle E^1 aa^2 aa^3 aa^4 aa^5 aa^6 aa^7 aa^8 P^9 aa^{10} aa^{11} P^{12} P^{13}$	Evasin-13a, b,... n

onde:

P é sempre prolina. Os demais poderão ser L- ou D-aminoácidos e derivados que estão apresentados com o código de três e uma letra

ácido aspártico (Asp, D)

ácido glutâmico (Glu, E)

alanina (Ala, A)

arginina (Arg, R)

asparagina (Asp, D)

fenilalanina (Phe, F)

glicina (Gly, G)

glutamina (Gln, Q)

histidina (His, H)

isoleucina (Ile, I)

leucina (Leu, L)

lisina (Lys, K)

prolina (Pro, P)

serina (Ser, S)

tirosina (Tyr, Y)

treonina (Thr, T)

triptofano (Trp, W)

valina (Val, V)

ácido aminobutírico (Abu)

ácido aminoisobutírico (Aib)

(36)

ácido diaminobutanóico (Dab)

ácido diaminopropiônico (Dpr)

ácido hexanóico (ϵ -Ahx)

ácido isonipecótico (Isn)

ácido piroglutâmico (Pyr, <E)

ácido tetrahydroisoquinolina-3-carboxílico (Tic)

5 butil-glicinaciclohexilalanina (Cha)

citrulina (Cit)

estatina e derivados (Sta)

fenilglicina (Phg)

hidroxiprolina (Hyp)

homoserina (Hse)

norleucina (Nle)

norvalina (Nva)

ornitina (Orn)

10 penicilalanina (Pen)

sarcosina (Sar)

tietilalanina (Thi)

<E¹ ácido piroglutâmico é o aminoácido N-terminal;

aa² é um aminoácido geralmente W, S, ou K para as fórmulas I e II, geralmente D para fórmula III e geralmente W, S, G ou N para as fórmulas IV a IX;

15 aa³ é geralmente W, P, F ou G para as fórmulas I a III e geralmente P, G, W ou R para as fórmulas IV a IX;

aa⁴ é um aminoácido geralmente P, A ou R para as fórmulas I a III e geralmente P, A, R ou W para as fórmulas IV a IX;

20 aa⁵ é um aminoácido geralmente R ou I para as fórmulas II e III e geralmente T, P, G, H, R, W ou E para as fórmulas IV a IX;

aa⁶ é um aminoácido geralmente Q, N, P, T, H, R ou G para as fórmulas V, VII, VIII e IX; é frequentemente I, A, T ou Y para a fórmula IV

aa⁷ é um aminoácido geralmente N, Q, G ou R para as fórmulas VI, VIII e IX e é frequentemente I, A, T ou Y para a fórmula V;

25 aa⁸ é um aminoácido geralmente Q, P ou G para as fórmulas VII e IX é frequentemente I, A, T ou Y para a fórmula VI;

aa⁹ é um aminoácido geralmente Q, N ou G para a fórmula VIII é frequentemente I, A, T ou Y para a fórmula VII;

30 aa¹⁰ é um aminoácido geralmente Q e E para a fórmula IX e é frequentemente I, A, T ou Y para a fórmula VIII;

aa¹¹ para a fórmula IX é frequentemente I, A, T ou Y;

(37)

com as ciclodextrinas, seus derivados, lipossomas e os polímeros biodegradáveis e/ou misturas.

3. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais caracterizado pela utilização dos Evasins 7a, 10c, 11e, 12b e seus respectivos análogos estruturais e/ou conformacionais como modelos moleculares para o desenvolvimento de fármacos e/ou formulações com base em compostos peptídicos e/ou não-peptídicos.
4. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com a reivindicações 1, 2 e 3 caracterizado por apresentar atividade inibitória diferencial para a endopeptidase neutra e a enzima conversora de angiotensina I.
5. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com a reivindicações 1, 2 e 3 caracterizado por apresentar menor atividade inibitória sobre a endopeptidase neutra.
6. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com a reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5 caracterizado pela menor incidência de efeitos colaterais, como tosse e angioedema.
7. Processo de utilização dos Evasins como modelos moleculares para o desenvolvimento de fármacos e/ou formulações com base em compostos peptídicos e/ou não-peptídicos caracterizados por apresentar atividade vasodilatadora e/ou vasoprotetora por ação direta no endotélio.
8. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com as reivindicações de 1 a 4 caracterizado pelo uso no estudo e o tratamento da hipertensão arterial, outras doenças cardiovasculares e suas complicações, feridas, queimaduras, eritemas, tumores, diabetes melitus, motilidade espermática e bloqueio de espermatogênese, nefropatias, impotência sexual, distúrbios gastrointestinais e ginecológicas, angiogênese, alopecia, doenças sangüíneas e angioplastia em animais de sangue quente, de derrame cerebral, infarto agudo do miocárdio ou morte cardiovascular, renoproteção nos casos de falha renal ou nefropatia diabética, hipertrofia ventricular esquerda, afinamento vascular, re-estenoses pós angioplastia, angiopatia diabética, isquemia periférica, angina e progressão de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio e aterosclerose.

(38)
A

9. Processo de preparação de formulações de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 caracterizadas pela mistura de soluções organo-aquosas de ciclodextrinas ou derivados de ciclodextrinas selecionados do grupo contendo alquil, hidroxialquil, hidroxipropil e acil ou ciclodextrinas com ligação cruzada ou polímeros de ciclodextrinas com soluções organo-aquosas dos Evasins e/ou dos seus análogos.
10. Processo de preparação de formulações de Evasins e/ou dos seus análogos estruturais caracterizado pelo uso das ciclodextrinas, derivados de ciclodextrinas, lipossomas, polímeros biodegradáveis, derivados de polímeros biodegradáveis ou misturas desses sistemas.
11. Processo de utilização dos Evasins como modelos moleculares para o desenvolvimento de fármacos e/ou formulações com atividade inibitória diferencial para a endopeptidase neutra e a enzima conversora de angiotensina I, caracterizados por menor atividade inibitória para a endopeptidase neutra e em consequência com menor possibilidade de incidência de efeitos colaterais como tosse e angioedema.
12. Preparação de formulações caracterizadas pela mistura de soluções organo-aquosas de ciclodextrinas ou derivados de ciclodextrinas selecionados do grupo contendo alquil, hidroxialquil, hidroxipropil e acil ou ciclodextrinas com ligação cruzada ou polímeros de ciclodextrinas com soluções organo-aquosas dos Evasins e/ou dos seus análogos, para estudo e tratamento da hipertensão arterial, outras doenças cardiovasculares e suas complicações, feridas, queimaduras, eritemas, tumores, diabetes melitus, motilidade espermática e bloqueio de espermatogênese, nefropatias, impotência sexual, desordens gastrointestinais e ginecológicas, angiogênese, alopecia, doenças sanguíneas e angioplastia.
13. Preparação de formulações caracterizadas pela mistura de soluções organo-aquosas de ciclodextrinas ou derivados de ciclodextrinas selecionados do grupo contendo alquil, hidroxialquil, hidroxipropil e acil ou ciclodextrinas com ligação cruzada ou polímeros de ciclodextrinas com soluções organo-aquosas dos Evasins e/ou dos seus análogos, para uso como anti-concepcional masculino.
14. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo aumento da biodisponibilidade dos referidos peptídeos.

(39)
4

15. Preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizada pelo aumento da duração e/ou eficácia do efeito.
- 5 16. Processo de preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo uso da mistura de excipientes aceitáveis farmacologicamente, incluindo água, solução salina, soluções tamponadas, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank, soluções salinas biocompatíveis, contendo ou não polietileno glicol para o uso no tratamento de emergência hipertensiva.
- 10 17. Preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 caracterizada pelas vias de aplicação oral, intramuscular, intravenosa, subcutânea, tópica, inalação (pulmonar, intranasal, intrabucal) ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados, para estudo e tratamento da hipertensão arterial, outras doenças cardiovasculares e suas complicações, feridas, queimaduras, eritemas, tumores, diabetes melitus, motilidade
- 15 espermatócica e bloqueio de espermatogênese, nefropatias, impotência sexual, distúrbios gastrointestinais e ginecológicos, angiogênese, alopecia, doenças sanguíneas e angioplastia em animais de sangue quente.
- 20 18. Preparação de formulações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 15 e 16 caracterizada por apresentar indicação para o estudo e o tratamento de derrame cerebral, infarto agudo do miocárdio ou morte cardiovascular, renoproteção nos casos de falha renal ou nefropatia diabética, hipertrofia ventricular esquerda, afinamento vascular, re-estenoses-pós angioplastia, angiopatia diabética, isquemia periférica, angina e progressão de
- 25 insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio, prevenção e tratamento de aterosclerose.

(40)
L

Resumo

"Processo de Preparação de Formulações farmacêuticas e/ou Produtos Associados para o desenvolvimento de aplicações dos Evasins e seus análogos Estruturais e/ou Conformacionais em Doenças Crônico-Degenerativas".

5 A presente invenção caracteriza-se pelo processo de preparação de formulações farmacêuticas para o desenvolvimento de aplicações dos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais em doenças crônico-degenerativas. Caracteriza-se ainda pelo processo de preparação das formulações farmacêuticas e/ou produtos associados dos
10 peptídeos Evasins e seus análogos estruturais e/ou conformacionais usando as ciclodextrinas, seus derivados, lipossomas e os polímeros biodegradáveis e/ou misturas desses sistemas.

A presente invenção caracteriza-se também pela identificação de mecanismos bioquímicos e fisio-farmacológicos dissociados dos efeitos sobre a metabolização da bradicinina e angiotensina II que contribuem para o mecanismo de ação desses peptídeos em
15 patologias crônico-degenerativas.

Nenhuma aplicação usando os Evasins e seus análogos, usando as ciclodextrinas, lipossomas, os polímeros biodegradáveis e seus derivados para o estudo e tratamento de hipertensão arterial ou outras doenças cardiovasculares e/ou crônico-degenerativas foi encontrado no estado da técnica. Isso caracteriza a presente invenção como uma nova
20 alternativa mais eficaz para o estudo e tratamento dessas patologias e suas complicações.

Caracteriza-se ainda pelo aumento da eficácia do referido peptídeo e seus análogos associados com ciclodextrinas quando aplicados em ratos, isso caracteriza um aumento na biodisponibilidade do peptídeo e seus análogos nas formulações da presente invenção.